



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**Identificación de hemoparásitos presentes en
dos especies del género *Lithobates* del
sureste de México**

QUE PRESENTA LA ALUMNA
Daniela Vega Becerra
Matrícula: 2162030204

ASESOR
Miguel Ángel Mosqueda Cabrera
Depto. El Hombre y su Ambiente
No. Ec. 22011

Ciudad de México, agosto, 2021

Resumen: En sus hábitats acuáticos y terrestres las ranas se encuentran expuestas a numerosos vectores hematófagos, por lo que ocupan una posición ideal para adquirir parásitos sanguíneos intra y extracelulares. Entre los parásitos sanguíneos más documentados en ranas se encuentran protozoos del género *Trypanosoma*. El objetivo de la presente investigación fue la identificación de hemoparásitos presentes en dos especies de ranas a partir de un acervo de imágenes obtenidas de las ranas *Lithobates berlandieri* de Tlacotalpan, Veracruz; y *Lithobates spectabilis* de Ixhuatán, Oaxaca. Se seleccionaron las imágenes con los hemoparásitos más representativos y se obtuvieron sus medidas morfométricas para su análisis e identificación. Los hemoparásitos observados en 44 ranas de la especie *L. berlandieri* fueron *Trypanosoma* spp. I, II y III, *Trypanosoma bufophlebotomi*, *Hepatozoon* en su forma libre y madura, y microfilarias del nemátodo *Folleyellides striatus*; la mayor prevalencia de infección la presentó *T. bufophlebotomi* con el 43.18%. Por otra parte, en las 16 ranas de *L. spectabilis* se observaron *Trypanosoma* sp. I, *T. bufophlebotomi* y *Hepatozoon* en su forma libre; la mayor prevalencia de infección la obtuvo *Trypanosoma* sp. I con 43.75%. Las diferencias significativas que existen en las prevalencias de las diferentes especies de hemoparásitos en *L. berlandieri* y *L. spectabilis* reflejan el comportamiento de estos hospederos debido a los vectores a los que se encuentran expuestos. El estudio detallado de la biología de los hemoparásitos presentes en anfibios de México es necesario para la identificación, descripción, ciclo de vida y la correcta clasificación de las especies.

Índice

1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. Generalidades de los anfibios.....	2
2.2. Importancia de los anfibios.....	2
2.3. Anfibios en México.....	3
2.4. Generalidades de los parásitos.....	3
2.5. Parasitismo.....	4
2.6. Importancia de los parásitos en los ecosistemas.....	5
2.7. Hemoparásitos en anfibios.....	5
2.8. Conocimiento actual del estado que guarda una temática.....	6
3. Objetivos	6
3.1. General.....	6
3.2. Particulares.....	6
4. Material y métodos	7
4.1. Obtención de datos.....	7
4.2. Identificación de hemoparásitos.....	7
4.3. Prevalencia de infección.....	8
4.4. Estado actual de hemoparásitos en anfibios de México y sus mecanismos de transmisión.....	8
5. Resultados	9
5.1. Descripción de las especies identificadas.....	10
5.2. Prevalencia de la infección.....	12
6. Discusión	13
6.1. Conocimiento actual de hemoparásitos en anfibios de México.....	16
7. Conclusiones	17
8. Referencias	17

1. Introducción

Los anfibios son uno de los grupos de vertebrados más vulnerables a alteraciones en el ecosistema como la urbanización, contaminación, introducción de especies invasoras, fragmentación y pérdida del hábitat (Campiao *et al.*, 2015), se ha demostrado que el 41% de estos organismos están en peligro de extinción (UICN, 2018). La mayor concentración de anfibios se encuentra en América Latina, y en México se distribuyen 409 especies de ellos, ubicándolo como el quinto país con mayor riqueza a nivel mundial (Frost, 2013).

Una de las características más importantes de los anfibios es su piel altamente permeable a contaminantes presentes en el ambiente al que se encuentran expuestos, esto les permite funcionar también como bioindicadores de un ecosistema (Bosch, 2003); además de hacerlos susceptibles a contraer enfermedades por agentes patógenos como bacterias, virus, hongos y parásitos (Santos, 2004). En sus hábitats acuáticos y terrestres, los anfibios están expuestos a una variedad de vectores hematófagos y, por consiguiente, se encuentran en una posición ideal para adquirir parásitos sanguíneos (Barta & Dessler, 1984).

Aunado a esto, la mayoría de los estudios realizados con endoparásitos sanguíneos en anfibios han estado relacionados con helmintos, donde se han considerado aspectos de distribución, ecología y dinámica de poblaciones, mientras que muy pocos estudios se han centrado en protozoarios (Cabagna *et al.*, 2009), limitándose a ciertas regiones del mundo, como en Costa Rica (Dessler, 2001), en el Litoral Argentino (Cabagna *et al.*, 2009) y en Uganda (Readel & Goldberg, 2010).

En México solo el 14% de las especies de anfibios se han estudiado para identificación de helmintos (Paredes *et al.*, 2004), dejando de lado el estudio de parásitos sanguíneos. Todos estos trabajos contribuyen a la difusión de diversos aspectos de los anfibios de México, pero por ser limitados a ciertas áreas o temáticas, no proporcionan una visión general del conocimiento en un momento determinado. Por esta razón, la presente investigación pretende identificar los hemoparásitos presentes en anfibios en un acervo de imágenes bajo resguardo del asesor de esta investigación; y, compilar el conocimiento actualizado sobre la diversidad hemoparásita en anfibios de México.

2. Marco teórico

2.1. Generalidades de los anfibios

Los anfibios son un grupo muy diverso de vertebrados que, en la actualidad, se clasifican en 3 órdenes: Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras y tritones) y Gymnophiona (cecilias) (Halliday & Adler, 2007). Cada orden presenta características específicas en algunos aspectos de su morfología e historia natural (Parra *et al.*, 2014). El orden anura, compuesto por 6 200 especies, es el más abundante y diversificado de los anfibios vivientes (Frost, 2013). Las especies de este grupo se encuentran en hábitats acuáticos, terrestres, fosoriales —adaptados a la excavación y vida subterránea— y arborícolas en prácticamente todos los continentes (Heyer *et al.*, 2001; Halliday & Adler, 2007).

Los anuros pueden presentar diferencias morfológicas dependiendo de su forma de vida. En México, por ejemplo, los anuros semiacuáticos del género *Lithobates* tienen la cabeza puntiaguda, cuerpo hidrodinámico y extremidades posteriores muy largas con dígitos largos y palmeados (Halliday & Adler, 2007).

2.2. Importancia de los anfibios

Los anfibios desempeñan un rol multifuncional en un ecosistema ya que responden a alteraciones de éste, así mismo los anfibios presentan una extraordinaria dependencia con el medio donde viven motivada con su relativa escasa movilidad, por un lado, su doble ciclo vital —acuático y terrestre— les hace vulnerables a alteraciones producidas en ambos medios (Bosch, 2003). Además, son parte de la cadena trófica de muchos otros organismos porque ocupan diversas posiciones: desde detritívoros hasta predadores y presas, por lo que su presencia inevitablemente repercute en otras especies y el entorno social (Parra *et al.*, 2014). Los anuros, al tener un rol como depredador, fungen como controladores de insectos como los mosquitos —que actúan como vectores de infección—, por lo que la presencia de estos organismos disminuye la propagación de estos transportadores de enfermedades que en los humanos puede llegar a tener grandes consecuencias (Santos, 2004).

Debido a su piel muy delgada y permeable absorben rápidamente contaminantes disueltos en el agua, la lluvia ácida o las radiaciones, por lo que los anfibios tienen la peculiaridad de ser

excelentes bioindicadores, de igual forma sus huevos carecen de protección lo cual los hace aún más vulnerables (Mattoon, 2000).

2.3. Anfibios en México

De acuerdo con Toledo (1987), el mayor número de endemismos de anfibios y reptiles en México se presenta en dos áreas principales: Eje Neovolcánico y la Sierra Madre del Sur.

La distribución de anfibios denota una marcada diferencia entre los estados de Oaxaca, Chiapas y Veracruz con el resto del país. El primer lugar lo ocupa el estado de Oaxaca con una diversidad de 140 especies, mientras que el segundo y tercer lugar lo ocupa Chiapas con 100 especies y Veracruz con 96, respectivamente. Este mismo orden se presenta cuando se consideran sólo los anuros, Oaxaca presenta el primer lugar con 97 especies, Chiapas con 76 y Veracruz con 62 (Parra *et al.*, 2014).

2.4. Generalidades de los parásitos

Los parásitos se pueden distinguir de acuerdo con su tamaño. Ecológicamente, se clasifican en microparásitos que se caracterizan por un tamaño relativamente pequeño, rápida reproducción y desarrollo dentro del hospedero, en este grupo encontramos a los virus, bacterias y protozoos. Por otro lado, se encuentran los macroparásitos, los cuales se identifican por tener un tamaño más grande —a comparación con los microparásitos— y por no llevar a cabo su ciclo de vida dentro de un solo hospedero, ejemplos de estos son los nemátodos, tremátodos, acantocéfalos, entre otros (Anderson, 2000).

Otra forma de clasificar a los parásitos es de acuerdo con su ubicación en el hospedero, clasificándolos así en ectoparásitos —cuando los parásitos se encuentran a lo largo de la piel—, donde permanecen protegidos con las plumas o pelaje del hospedero, y endoparásitos los cuales se alojan en el interior del hospedero formando madrigueras debajo de la piel, o habitando por el torrente sanguíneo, el corazón, cerebro, tracto digestivo, hígado etc. (Smith & Smith, 2007).

Por otro lado, las comunidades de parásitos difieren de las de otros organismos, ya que una sola especie de parásito puede encontrarse en un solo hospedero, en una población de

hospederos e incluso en múltiples poblaciones de hospederos que se encuentren infectados por algunos estados de desarrollo del parásito (Rivera, 2010).

2.5. Parasitismo

El parasitismo es una forma de interacción ecológica, en la cual, un miembro, el parásito, se beneficia por el uso de recursos reunidos por otro miembro, el hospedero (Rico-Hernández, 2004).

Entre sus interacciones se pueden presentar diferentes manifestaciones simbióticas, que van desde mutualismo, comensalismo hasta una competencia. Los parásitos están presentes en prácticamente todos los organismos, de los cuales obtienen los nutrientes y el entorno con condiciones favorables para su reproducción. Algunos viven siempre como parásito —parásitos obligados—, aunque hay otros que pueden tener vida libre —parásitos facultativos— (Romero, 2007).

A través de su historia evolutiva, las especies han convivido con poblaciones de parásitos que han regulado, junto con otras interacciones ecológicas, tanto sus tamaños y sus estructuras poblacionales como su estructura genética (O'Brien & Evermann, 1988; Dobson & Hudson, 1992; Barlow, 1996).

Existen muchos tipos de asociaciones en los que hay interacciones de evolución recíproca —coevolución— entre los miembros de la asociación. Se ha entendido por coevolución el cambio en la estructura genética de cada una de las especies interactuantes en respuesta al cambio genético de la otra especie (Rico-Hernández, 2011). Anderson (1991), por su parte, considera que la naturaleza básica del modelo de vida de un parásito supone que los parásitos y los hospederos coevolucionan de una forma dinámica.

La reproducción extensiva de un parásito dentro de un hospedero aumenta el número de parásitos disponibles para infectar a otros hospederos. Si esto ocurre, la reproducción de los hospederos se puede ver afectada de manera adversa y su inmovilización o muerte reducirán la probabilidad del parásito de infectar a otros (Rico-Hernández, 2011).

2.6. Importancia de los parásitos en los ecosistemas

Los parásitos funcionan como bioindicadores al ser una alternativa para evaluar indirectamente la contaminación de un ecosistema. Estudios recientes se han centrado en parásitos como los helmintos, debido a que sirven como bioindicadores de la calidad del agua, sobre todo los helmintos de peces; también han sido utilizados como pruebas contemporáneas de biodiversidad y como organismos que permiten monitorear el estado de los ecosistemas (Monks, 2013).

Además, debido al conocimiento de los ciclos de vida de los parásitos, la presencia o ausencia de estos hace posible inferir la riqueza de vertebrados e invertebrados en un hábitat determinado. De igual manera, pueden ser indicadores del estrés de un hospedero, lo que nos puede indicar que se sufren alteraciones ambientales (Monks, 2013).

Según Thomas *et al.* (2006) una forma en la que los parásitos influyen de manera indirecta en un ecosistema es a través del impacto de una especie introducida; cuando las especies exóticas excluyen a determinadas especies nativas, la comunidad parasitaria vinculada a esa especie nativa también puede ser excluida.

2.7. Hemoparásitos en anfibios

En sus hábitats acuáticos y terrestres, los anfibios están expuestos a una variedad de vectores hematófagos y, por consiguiente, se encuentran en una posición ideal para adquirir parásitos sanguíneos (Barta & Dessler, 1984).

Son varios los factores que pueden influir sobre las poblaciones de parásitos en anfibios, tales como el ciclo biológico, dieta del hospedero, edad, tamaño y hábitat (Brooks *et al.*, 2006; Hamann *et al.*, 2006; Campião *et al.*, 2015).

Los anuros, al estar expuestos a numerosos vectores hematófagos, están infectados por una gran diversidad de hemoparásitos intra y extracelulares. Entre estos se cuentan las microfilarias —observadas en distintos lugares del mundo—, y especies de los géneros *Trypanosoma*, *Hepatozoon*, entre otros (Walton, 1964; Levine & Nye, 1977; Barta & Dessler, 1984; Dessler, 2001; Chutmongkonkul *et al.*, 2006; McKenzie & Starks 2008).

2.8. Conocimiento actual del estado que guarda una temática

La presente propuesta de trabajo de servicio social tiene, entre otros, la finalidad de realizar una revisión sobre el estado actual del estudio de hemoparásitos de anfibios en México. En este sentido, un artículo de revisión tiene como objetivo el análisis retrospectivo de estudios compilados en la literatura sobre un tema que se considera interesante para un público general o especializado. Su importancia se debe a que contribuyen a la actualización, síntesis y difusión de nuevos conocimientos (Reyes, 2020).

En la actualidad existen varias clasificaciones referidas al artículo de revisión. La revisión exhaustiva de todo lo publicado sobre cierto tema es uno de los tipos de revisión más utilizado. Se trata de una selección de datos recopilados de la literatura, presentados a los lectores como una síntesis a la cual los autores de la revisión agregan sus propios comentarios, conclusiones y recomendaciones (Reyes, 2020), ofrecen una visión amplia de un cierto tema, pero no garantizan dar una respuesta definida o imparcial a preguntas que debieron plantearse antes de realizar la revisión (Merino-Trujillo, 2011).

3. Objetivos

3.1. General

Identificar a las especies de hemoparásitos presentes en dos hospederos del género *Lithobates* a partir de un acervo de imágenes.

3.2. Particulares

- Conocer la prevalencia de infección por especie de hemoparásitos en *L. berlandieri* y *L. spectabilis*.
- Discutir los mecanismos de transmisión hacia el hospedero para cada especie de hemoparásito identificado.
- Conocer el estado actual que guarda el conocimiento de hemoparásitos en anfibios de México.

4. Material y métodos

4.1 Obtención de datos

El material principal de esta investigación fue un acervo de imágenes a resguardo por el asesor de este informe. Las imágenes fueron obtenidas a partir de muestras sanguíneas de las ranas *Lithobates berlandieri* en Tlacotalpan, Veracruz; y de *Lithobates spectabilis* en Ixhuatán, Oaxaca. Los muestreos se realizaron en junio de 2018 y octubre de 2019, respectivamente.

A cada rana se le realizó un frotis sanguíneo, el cual fue teñido con la técnica Giemsa & Wright, y posteriormente observado en el microscopio óptico con el máximo objetivo seco (40x). Las fotografías se tomaron con ayuda de una cámara digital montada sobre un microscopio óptico (Figura 1).

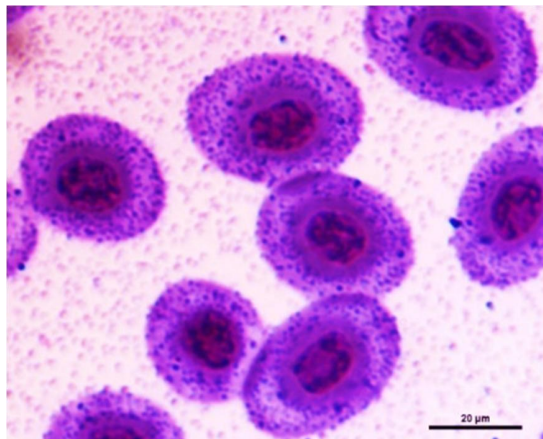


Figura 1. Muestra sanguínea teñida con Giemsa y observada en el microscopio óptico.

4.2. Identificación de hemoparásitos

Se seleccionaron las imágenes más representativas y se agruparon de acuerdo con la especie de su hospedero. A cada grupo se le asignó una clave de las dos primeras letras de su localidad —TL para *L. berlandieri* en Tlacotalpan e IX para *L. spectabilis* en Ixhuatán— seguida de dos números de acuerdo con el orden en que se presentó la imagen. Las medidas morfométricas de cada hemoparásito fueron realizadas con el software Fiji-ImageJ2 (Schindelin, 2012) (Figura 2). Posteriormente, con las medidas obtenidas se realizó un análisis clúster utilizando el software PAST versión 3.

Se hizo una revisión bibliográfica extensa sobre la morfología y medidas de las estructuras de hemoparásitos del género *Trypanosoma* para la correcta identificación de cada especie presente en el acervo de imágenes.

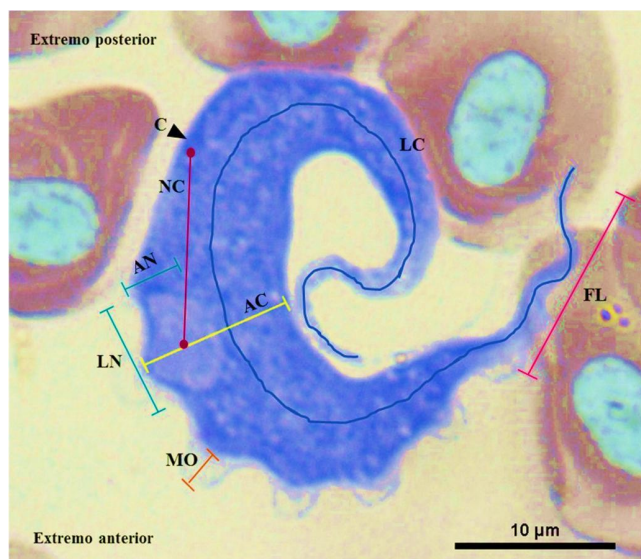


Figura 2. Representación de las medidas morfométricas realizadas a los especímenes de *Trypanosoma* spp. LC longitud de la célula, AC ancho de la célula a nivel del núcleo sin tocar la membrana ondulatoria, LN longitud del núcleo, AN ancho del núcleo, NC distancia desde el centro del núcleo al cinetoplasto, MO altura de la membrana ondulatoria, FL flagelo libre y C cinetoplasto.

4.3. Prevalencia de infección

Para cada especie de rana, se determinó la prevalencia de infección —expresada en porcentaje— como el número de hospederos infectados con algún hemoparásito, dividido por el número de hospederos examinados (DeJong & Muzall, 2000); con un intervalo de confianza del 95%.

4.4. Estado actual de hemoparásitos en anfibios de México y sus mecanismos de transmisión

Se realizó una revisión exhaustiva de la bibliografía publicada sobre hemoparásitos en anfibios de México, con la finalidad organizar, examinar e integrar la información que contenga datos novedosos o revisiones del tema general. Adicionalmente se analizó la literatura y publicaciones científicas en las que se incluyen los diferentes mecanismos de transmisión de cada hemoparásito identificado hacia su hospedero, contrastando los fenómenos biológicos que favorecen la ocurrencia de dicha interacción.

5. Resultados

Del acervo de imágenes únicamente nueve de ellas presentaron características como nitidez, enfoque e iluminación que permitieron analizarlas, de las cuales siete corresponden a parásitos presentes en *L. berlandieri* de la localidad de Tlacotalpan y dos de *L. spectabilis* de Ixhuatán.

Fue posible obtener todas las medidas de la mayoría de las imágenes, salvo un caso de la cual no se obtuvieron siete de las trece características. Se observó una variación considerable entre los organismos; por ejemplo, los hemoparásitos que presentaron mayor longitud del cuerpo fueron los de las imágenes TL-03, seguido por TL-02, cuyo flagelo libre y núcleo fue considerablemente más grande que el del resto. Las imágenes TL-05 e IX-02 presentaron la mayor y menor distancia desde el núcleo al cinetoplasto, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Medidas morfométricas de hemoparásitos del género *Trypanosoma* en *L. berlandieri* y *L. spectabilis*. TL Tlacotalpan e IX Ixhuatán. Todas las medidas están en micras.

Clave de fotografía	Observación (µm)												
	LC	LF	AC	NL	NA	NC	EA	EP	CA	CP	MO	NO	FL
TL-01	78.45	64.37	9.77	4.54	6.76	7.82	32.88	43.19	34.91	40.59	2.25	8	14.08
TL-02	82.27	57.78	8.80	7.01	4.13	9.30	47.39	29.50	58.48	27.82	2.50	0	24.49
TL-03	91.12	74.72	11.97	-	-	-	-	-	-	-	2.54	7	16.40
TL-05	67.59	52.34	8.35	4.33	3.01	14.47	30.99	37.39	44.90	23.59	2.56	4	15.25
TL-06	70.20	56.80	8.45	5.17	2.98	8.35	30.29	37.52	42.26	30.84	2.20	6	13.40
TL-07	71.63	57.75	8.32	4.55	3.43	7.34	31.55	37.33	40.77	31.87	2.37	8	13.88
TL-08	77.96	62.43	8.39	5.73	3.83	9.69	36.84	37.47	47.35	32.48	1.38	8	15.53
IX-01	60.73	48.18	12.52	4.48	5.10	7.75	34.45	27.36	46.46	22.82	3.23	6	12.55
IX-02	71.41	60.34	7.03	6.17	4.48	6.61	29.16	39.27	37.35	35.65	1.63	7	11.07

LC longitud de la célula, LF longitud de la célula sin el flagelo libre, AC ancho de la célula, NL longitud del núcleo, NA ancho del núcleo, NC distancia desde el centro del núcleo al cinetoplasto, EA extremo anterior al núcleo, EP extremo posterior al núcleo, CA extremo anterior al cinetoplasto, CP extremo posterior al cinetoplasto, MO altura de la membrana ondulatoria, NO número de ondulaciones y FL longitud del flagelo libre.

El análisis clúster reconoció cuatro ramificaciones del conjunto de datos obtenidos, dos de ellas en asociación, lo que indica que, debido a la naturaleza de los datos, cada ramificación —indicada en distinto color— pertenece a un morfotipo del género *Trypanosoma*. De izquierda a derecha se observa que la asociación II es la que presenta mayor cantidad de hemoparásitos con respecto al resto de las asociaciones. Los hemoparásitos de las imágenes TL-02 y TL-03 no se reconocen en ninguna de las asociaciones (Figura 3).

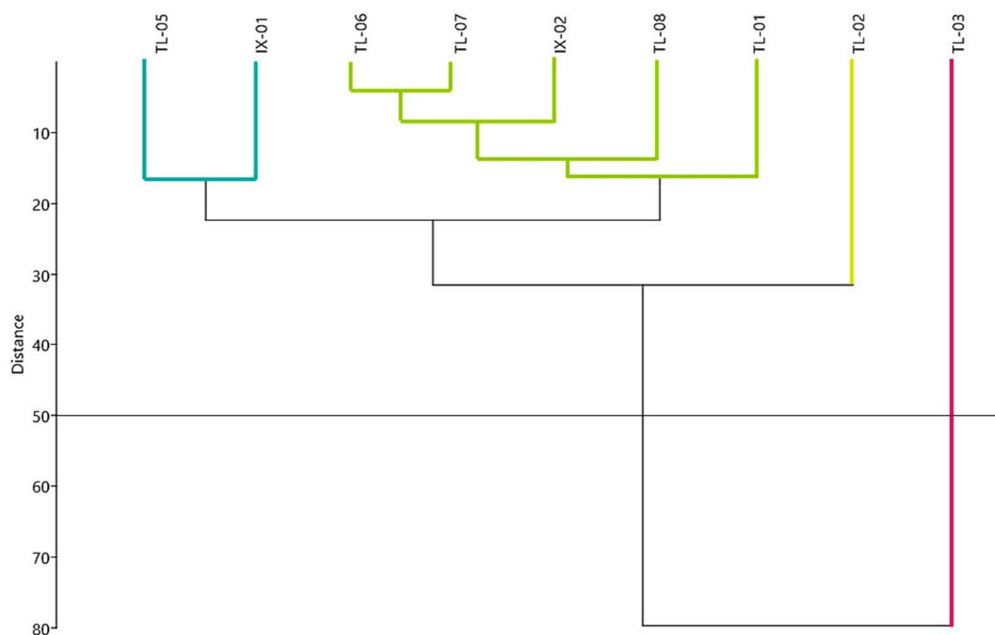


Figura 3. Análisis clúster de las medidas morfométricas de hemoparásitos del género *Trypanosoma*. **TL** Tlacotalpan, **IX** Ixhuatán; el número refiere al control de la imagen. La línea delgada en color negro representa el corte de los datos.

5.1. Descripción de las especies identificadas

Se observaron cuatro morfotipos del género *Trypanosoma*, de los cuales se identificó la especie de uno de ellos. A continuación, se describe cada uno de estos en el orden de ramificación del análisis clúster:

Trypanosoma sp. I. Presentó la longitud corporal más pequeña (Tabla 1), pero notablemente más ancha que el resto de las especies. Su núcleo es circular y pequeño, cercano a la mitad de la célula, justo al inicio de la de la membrana ondulatoria. Su cinetoplasto es ovalado y se localiza a tres cuartos de la célula en el extremo posterior y lejana al núcleo. Su membrana ondulatoria se diferencia bien del resto del cuerpo; el flagelo libre es corto (Figura 4).

Trypanosoma bufophlebotomi. La forma de su cinetoplasto es circular. Su núcleo se encuentra a la mitad de la célula, tiene forma circular y es, en promedio, más pequeño que el resto de las especies (Tabla 1), al igual que la distancia que hay entre éste y el cinetoplasto. Su membrana ondulatoria va de las cuatro a las ocho ondulaciones. Presenta un flagelo libre corto (Figura 4).

Trypanosoma sp. II. Es de gran longitud corporal (Tabla 1). Su núcleo es grande y se encuentra muy cercano al cinetoplasto con forma circular. Su membrana ondulatoria es muy

pronunciada, mostrando un tipo de ondulación diferente al resto de las especies. Su flagelo libre es muy largo. Solo se obtuvo una fotografía de este parásito, por lo que sus características no pueden apreciarse a detalle (Figura 4).

Trypanosoma sp. III. Fue la célula con mayor longitud y grosor de este estudio. Su flagelo libre es mediano con respecto al resto de las especies (Tabla 1). Al tener solo una fotografía de baja calidad de este parásito, no se pudieron apreciar y/o medir la mayoría de las estructuras que lo componen —como el cinetoplasto, el núcleo y la distancia que hay entre estos— (Figura 4).

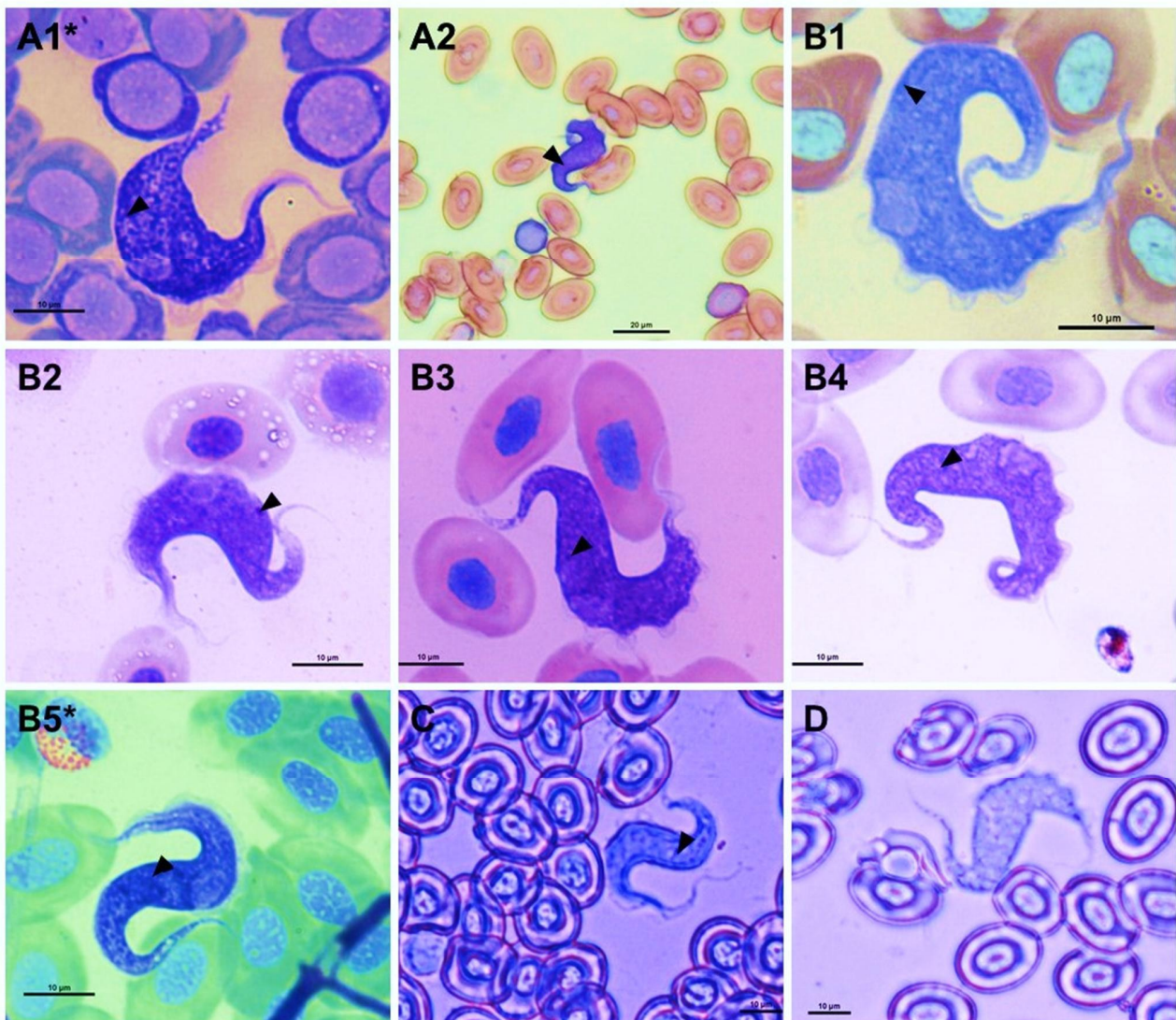


Figura 4. Especies de *Trypanosoma* observadas la presente investigación. **A1** y **A2** corresponden a *Trypanosoma* sp. I, **B1-B5** *Trypanosoma bufophlebotomi*, **C** *Trypanosoma* sp. II y **D** *Trypanosoma* sp. III. *Presentes en *L. spectabilis* de Ixhuatán; el resto de las fotografías fueron obtenidas de *L. berlandieri* de Tlacotalpan. La flecha indica la posición del cinetoplasto en el cuerpo.

Otras especies de hemoparásitos observadas fueron *Hepatozoon* sp. en su forma libre y madura y microfilarias del nemátodo *Folleyellides striatus* en *L. berlandieri*, mientras que para *L. spectabilis* solamente se observó *Hepatozoon* sp. libre (Figura 5).

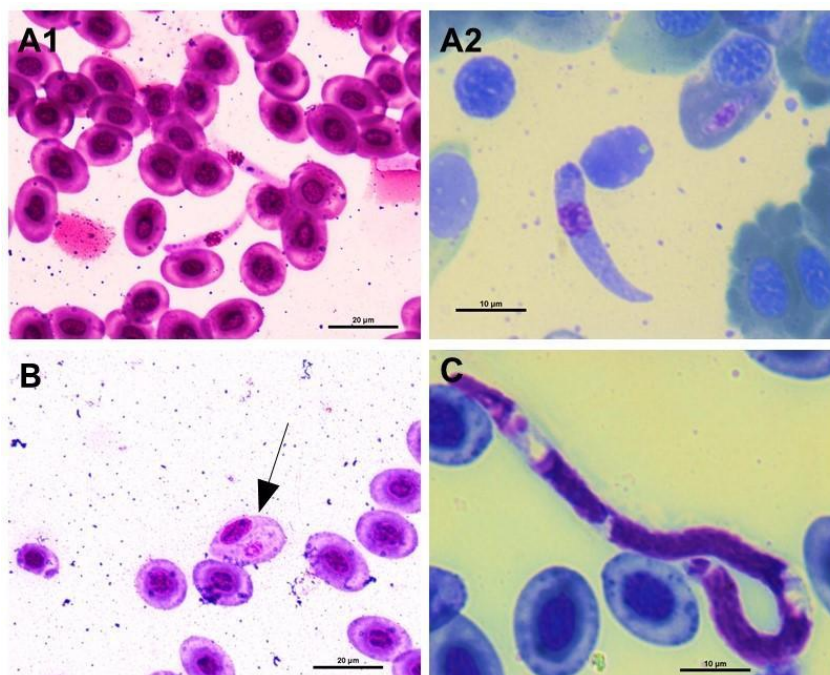


Figura 5. Otros hemoparásitos encontrados en *L. berlandieri* y *L. spectabilis*. **A1** y **A2** gamont libre de *Hepatozoon* en *L. berlandieri* y *L. spectabilis*, respectivamente, **B** *Hepatozoon* en su forma madura y **C** microfilaria del nemátodo *Folleyellides striatus* en *L. berlandieri*.

5.2. Prevalencia de la infección

Los hemoparásitos observados en 44 ranas de la especie *L. berlandieri* en la localidad de Tlacotalpan fueron *Trypanosoma* sp. I, II y III, *Trypanosoma bufophlebotomi*, *Hepatozoon* en su forma libre y madura, y microfilarias del nemátodo *Folleyellides striatus*. La mayor y menor prevalencia de infección fue para *T. bufophlebotomi* con el 43.18% y *Trypanosoma* sp. I, II y III con el 2.27%, respectivamente. Por otro lado, los hemoparásitos observados en las 16 ranas infectadas de *L. spectabilis* en la localidad de Ixhuatán fueron *Trypanosoma* sp. I, *T. bufophlebotomi* y *Hepatozoon* en su forma libre. La mayor prevalencia de infección la obtuvo *Trypanosoma* sp. I con 43.75%, y la menor fue para *T. bufophlebotomi* con 31.25% (Tabla 2).

Tabla 2. Prevalencia de la infección por hemoparásitos en dos especies de rana. **Hi** número de hospederos infectados; la prevalencia se encuentra expresada en porcentaje.

Hemoparásito	<i>L. berlandieri</i> n= 44		<i>L. spectabilis</i> n= 16	
	Hi	Prevalencia	Hi	Prevalencia
<i>Trypanosoma</i> sp. I	1	2.27	7	43.75
<i>Trypanosoma</i> sp. II	1	2.27	-	-
<i>Trypanosoma</i> sp. III	1	2.27	-	-
<i>Trypanosoma bufophlebotomi</i>	19	43.18	5	31.25
<i>Hepatozoon</i> libre	7	15.91	6	37.5
<i>Hepatozoon</i> maduro	6	13.64	-	-
<i>Folleyellides striatus</i>	9	20.45	-	-
Intervalo de confianza	6.29 ± 1.92		6 ± 0.49	

6. Discusión

Existe una gran dificultad en la literatura para designar el nombre de las especies de *Trypanosoma* presentes en ranas debido a la falta de datos biológicos, como las medidas morfométricas. Las diferentes especies pueden diferir en el tamaño y la forma del cuerpo, en la posición del núcleo y cinetoplasto, así como el grado de desarrollo de la membrana ondulatoria y el flagelo. Estas características a menudo se confunden con la extrema variabilidad morfológica y la ocurrencia de especies morfológicamente idénticas en diferentes hospederos del mundo (Moo, 2009).

La comparación de los cuatro morfotipos observados en la presente investigación con descripciones de otros autores permitió la identificación confiable de una de las especies. El organismo presentó las mismas características y medidas morfométricas de la especie *T. bufophlebotomi* Werner (1976) de *Bufo americanus* (Ayala, 1970; Werner, 1976; Werner *et al.*, 1988) y de *Bufo boreas* (Menezes, 2007). Los hemoparásitos de este estudio fueron ligeramente más grandes y presentaron las características más importantes que detalla Werner (1976), como la posición del cinetoplasto, la distancia entre este y el núcleo y la longitud del flagelo libre (Tabla 3).

No obstante a las comparaciones morfológicas realizadas y a la falta de datos sobre su biología, algunas formas de *Trypanosoma* fueron similares a las especies ya descritas, aunque pequeñas diferencias morfológicas no permitieron la identificación plena de *Trypanosoma* spp. I, II y III.

Tabla 3. Comparación de medidas morfométricas de hemoparásitos del género *Trypanosoma* en *L. berlandieri* y *L. spectabilis*. N número de hemoparásitos medidos, LC Longitud de la célula, AC Ancho de la célula, NA Ancho del núcleo, NL Longitud del núcleo, NC Distancia desde el centro del núcleo al cinetoplasto, EA Extremo posterior al núcleo, EP Extremo anterior al núcleo, CA Extremo anterior al cinetoplasto, CP Extremo posterior al cinetoplasto, FL Longitud del flagelo libre. Las medidas se presentan en micras.

Especie	N	LC	AC	NL	NA	NC	EA	EP	CA	CP	FL	Referencia
<i>Trypanosoma bufophlebotomi</i>												
media	30	60.40	8.20	4.50	4.50	5.20	32.40	28.10	-	23.60	16.10	(Werner, 1976)
rango		40 - 73	4 - 12	3 - 8	3 - 7	3 - 7	25 - 40	19 - 39	-	15 - 33	11 - 18	
<i>Trypanosoma bufophlebotomi</i>												
media	5	73.93	8.39	5.23	4.30	7.96	32.14	38.96	40.53	34.29	13.59	Presente
rango		70.2 - 78.5	7 - 9.8	4.5 - 6.2	2.9 - 6.8	6.6 - 9.7	29.1 - 36.8	37.3 - 43.2	34.9 - 47.4	30.8 - 40.6	11 - 15.5	investigación
<i>Trypanosoma</i> sp. 1												
media	2	64.16	10.44	4.41	4.06	11.11	32.72	32.38	45.68	23.21	13.90	Presente
rango		60.7 - 67.6	8.4 - 12.5	4.3 - 4.5	3 - 5.1	7.8 - 14.5	30 - 34.5	27.3 - 37.4	44.9 - 46.4	22.8 - 23.6	12.5 - 15.3	investigación
<i>Trypanosoma</i> sp. 2												
media	1	82.27	8.80	7.01	4.13	9.30	47.39	29.50	58.48	27.82	24.49	Presente
<i>Trypanosoma</i> sp. 3												
media	1	91.12	11.97	-	-	-	-	-	-	-	16.40	Presente
investigación												

Debido a estos problemas de clasificación, Werner (1993) y Zichus (2002) sugieren que estudios moleculares y morfológicos de *Trypanosoma* sean realizados para que ocurra una correcta identificación de las especies.

En la presente investigación se obtuvo una mayor prevalencia de hemoparásitos del género *Trypanosoma*, mostrando similitud con el estudio realizado por Dessler (2001) en Costa Rica. El hemoparásito que estuvo presente en ambas especies de rana fue *T. bufophlebotomi*, presentando la mayor prevalencia en *L. berlandieri* de Tlacotalpan (43.18%), lo que podría deberse a sus hábitos nocturnos debido a que, al salir del agua, esta rana podría permanecer expuesto a la picadura del mosquito *Lutzomyia vexator* (*Phlebotomus*), el cual ha sido atribuido como principal vector de este parásito (Ayala, 1970; 1971) (Figura 5). En *L. spectabilis* de Ixhuatán, *T. bufophlebotomi* fue el parásito que presentó menor prevalencia (31.25%), lo que podría deberse a la cantidad de hospederos muestreados, pues *L. vexator* presenta amplia distribución en México, sobre todo en zonas húmedas y cálidas (Moo, 2009) como las que presenta la localidad de Ixhuatán.

La microfilaria *Folleyellides striatus* tiene una distribución cosmopolita (Dessler, 2001), en países como Canadá (Barta & Dessler, 1984), Costa Rica (Dessler, 2001) y Nigeria (Aisien *et al.*, 2014). En la presente investigación, este hemoparásito solo se presentó en *L. berlandieri* obteniendo una de las mayores prevalencias (20.45%) y manifestando un contraste con los estudios realizados por Readel & Goldberg (2010) y Netherlands *et al.* (2015), en los cuales las ranas examinadas tuvieron prevalencias muy bajas —2.8% en Readel & Goldberg (2010) y 2% en Netherlands *et al.* (2015)—. Schacher & Crans (1973) describieron la transmisión de especies norteamericanas del género *Folleyella* por mosquitos de la especie *Culex territans* (Figura 5).

También se identificó *Hepatozoon* en su forma libre y madura en *L. berlandieri* de Tlacotalpan, con prevalencia de 15.91% y 13.64% respectivamente, mientras que en *L. spectabilis* de Ixhuatán solamente se presentó en su forma libre, obteniendo el 37.5% de prevalencia. Netherlands *et al.* (2015) obtuvo una prevalencia para *Hepatozoon* sp. del 14% en *Ptychadena anchietae*, una rana de hábitat acuático, la cual se encuentra a menudo en la orilla del agua. El autor menciona que la alta prevalencia de *Hepatozoon* sp. se explica por la abundancia de vectores posibles asociados con el agua, como mosquitos y sanguijuelas del género *Hirudo*. Por otra parte, Netherlands *et al.* (2014) atribuyen la infección de *Hepatozoon*

spp. a mosquitos de las especies *Culex territans* y *Culex pipiens* (Figura 5), por lo que *L. berlandieri* y *L. spectabilis* podrían estarse infectando dentro o fuera de los cuerpos de agua.

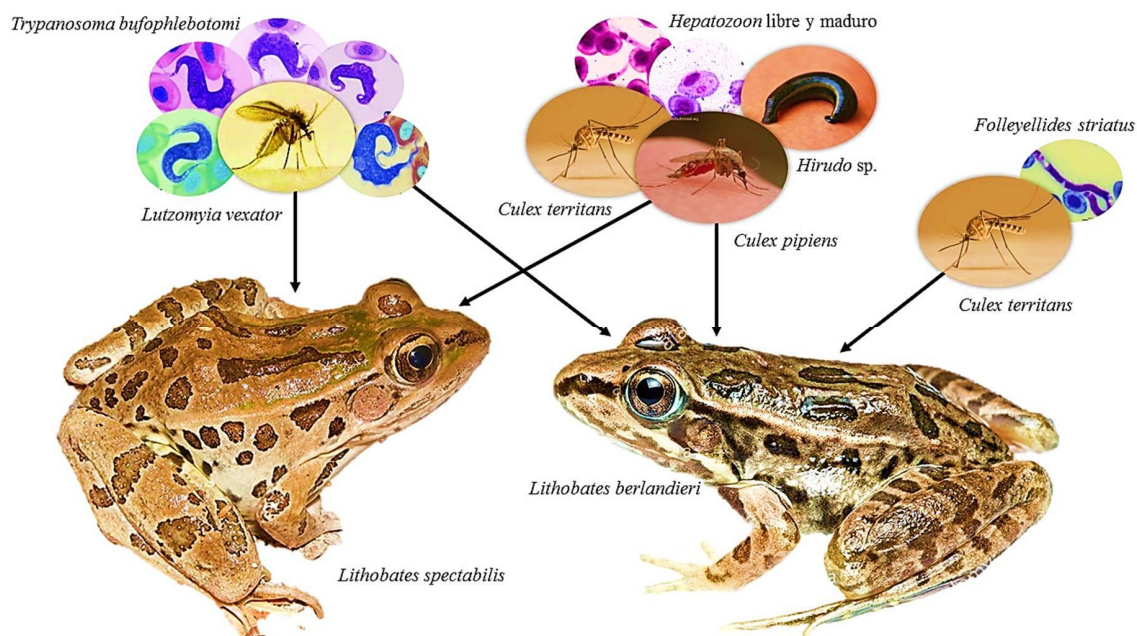


Figura 5. Esquematación de la transmisión de hemoparásitos por sus respectivos vectores a *L. spectabilis* de Ixhuatán y *L. berlandieri* de Tlacotalpan. *T. bufophlebotoми* es vectorizado por *L. vexator* hacia ambas especies de rana. *Hepatozoon* sp. es vectorizado por *C. territans*, *C. pipiens* y por sanguijuelas del género *Hirudo*, en su forma libre es transmitida a ambas especies de rana, y en su forma madura solo a *L. berlandieri*. La microfilaria *F. striatus* es vectorizado por *C. territans* e infecta solamente a *L. berlandieri*.

6.1. Conocimiento actual de hemoparásitos en anfibios de México

Máyen-Estrada *et al.* 2014 mencionan que *Trypanosoma* corresponde al género de hemoparásitos con mayor distribución geográfica en la República mexicana, sin embargo, se ha puesto especial énfasis en su estudio a través del conocimiento de la distribución de sus vectores (Bautista-López, 1993; Jiménez y Palacios, 1999; Sandoval-Ruiz *et al.*, 2004; Licón-Trillo *et al.*, 2010 y Salazar-Schettino *et al.*, 2010) o del estudio clínico en el humano, con especial énfasis en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* (Bautista-López, 1993; de Haro, 1997 y Salazar-Schettino *et al.*, 2011).

La mayoría de los estudios realizados con endoparásitos sanguíneos en anfibios en México han estado relacionados con helmintos, donde se han considerado aspectos de distribución, ecología y dinámica de poblaciones (Cabagna *et al.*, 2009), mientras que los aspectos abordados de los diferentes grupos de hemoparásitos no han sido documentados,

evidenciando la escasez de registros de especies y dificultando su identificación, debido entre otras características, a las dimensiones de los organismos, la falta de bibliografía sistemática y los problemas en su ubicación en los sistemas de clasificación.

7. Conclusiones

- Las diferencias existentes en las prevalencias de las diferentes especies de hemoparásitos en *L. berlandieri* y *L. spectabilis* evidencian indirectamente los vectores a los que se encuentran expuestos debido a su comportamiento.
- El estudio detallado de hemoparásitos en anfibios de México permitirá obtener información que enriquezca la identificación, descripción, ciclo de vida y la correcta clasificación de la diversidad de sus especies en futuras investigaciones.

8. Referencias

- Anderson, R. M. (1991). Populations and infectious diseases: ecology or epidemiology? *J. Animal Ecol.*, 60: 1-50.
- Aisien M., Aigbirior, P., Ovwah, E. & EdoTaiwo, O. (2015). Blood parasited of some Anuras from southern Nigeria. *Tropical Biomedice*, 35(4): 598-605.
- Anderson, R. C. (2000). *Nematode Parasites of Vertebrates*. 2da edición: Editorial CABI publishing.
- Ayala, S. C. (1970). Two new trypanosomes from California toads and lizards. *J. Protozool.*, 17: 370-373.
- Ayala, S. C. (1971). Trypanosomes in wild California sandflies and extrinsic stages in *Trypanosoma bufophlebotomi*, *J. Protozool.*, 18: 433-436.
- Barlow, N. D. (1996). The ecology of wildlife disease control: simple models revisited. *J. Appl. Ecol.*, 33: 303- 314.
- Bautista-López, N. M. (1993). *Estudio de transmisores de Trypanosoma cruzi en el estado de Morelos*. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 98 p.
- Barta, J. R. & Desser, S. S. (1984) Blood parasites of amphibians from Algonquin park, Ontario. *Wildlife Disease Association*, 20(3): 180-189.

- Becerril-Flores, M. A. & Valle-De La Cruz, A. (2003). Descripción de la enfermedad de Chagas en el Valle de Iguala, Guerrero, México. *Gaceta Médica de México*, 139: 539-544.
- Becerril, M. A., Angeles-Pérez, V., Noguéz-García, J. C. & Imbert-Palafox, J. L. (2010). Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el municipio de Metztlán, Estado de Hidalgo, México, mediante la caracterización de unidades domiciliarias y sus índices entomológicos. *Neotropical Entomology*, 39: 810-817.
- Bosch, J. (2003). Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *MUNIBE*, 56-73.
- Bravo, H. (1927). Flagelados encontrados en batracios y reptiles del Valle de México. *Memorias de la Sociedad Alzate*, 48: 385-390.
- Brooks, D. R., León, R. V., McLennan, D. A. & Zelmer D. (2006). Ecological fitting as a determinant of the community structure of platyhelminth parasites of anurans. *Ecology*, 87: 76-85.
- Cabagna, M. C., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Biancucci, G. S. & Bassó, A. (2009). Primeros registros de endoparásitos en cinco especies de anfibios anuros del Litoral Argentino. *Cuad. Herpetol.*, 23(1): 33-40.
- Campiao, K., Aquino, A., Cornell, S., Begon M. & Roland, L. (2015). Estimates of coextinction risk: how anuran parasites respond to the extinction of their hosts. *International Journal for Parasitology*, 45(14): 885–889.
- Chutmongkonkul, M., W. Khonsue & P. Pariyanonth. (2006). Blood parasites of six species of wild amphibians from Khun Mae Kuang forest area, Thailly. *Proceedings of AZWMP*, 48.
- De Haro, A. I. (1997). *Enfermedad de Chagas en una comunidad del Altiplano Mexicano*. Tesis de Posgrado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F., 101 p.
- DeJong, R. J. & Muzzall, P. M. (2000). Hematozoa of waterfowl from the Kellogg Biological Station area in southwestern Michigan. *J. Wildl. Dis.*, 36: 767-773.
- Desser, S. S. (2001). The blood parasites of anurans from costa rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. *Journal of Parasitology*, 87(1): 152-160.

- Dobson, A. P. & Hudson, P. J. (1992). Regulation and stability of a free-living host-parasite system: *Trichostrongylus tenuis* in red grouse. II. Population models. *J. Anim. Ecol.*, 61: 487-498.
- Espinoza, B., Solórzano-Domínguez, N., Vizcaino-Castillo, A., Martínez, I., Elias-López, A. L. & Rodríguez-Martínez, J. A. (2011). Gastrointestinal infection with Mexican TcI *Trypanosoma cruzi* strains: different degrees of colonization and diverse immune responses. *International Journal of Biological Sciences*, 7: 1357-1370.
- Frost, D. R. (2013). *Amphibian species of the world: an online reference*. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Galavíz-Silva, L., Molina-Garza, D. P., González-Santos, M. A., Mercado-Hernández, R., González-Galaviz, J. R., Rosales-Encina, J. L. & Molina-Garza, Z. J. (2009). Update on seroprevalence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies among blood donors in Northeast Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 404-406.
- Goldsmith, R. S., Kagan, I. G., Zárate, R., Reyes-González, M. A. & Cedeño-Ferreira, J. (1979). Estudios epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Oaxaca, México. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 87: 1-19.
- Halliday, T. & Adler, K. (2007). *La gran enciclopedia de los anfibios y reptiles*. Libsa, Madrid., 240 p.
- Hamann, M., González, C. & Kehr, A. (2006). Helminth community structure of the oven frog *Leptodactylus latinasus* (Anura, Leptodactylidae) from Corrientes, Argentina. *Acta Parasitol.*, 51: 294- 299.
- Heyer, R., M. Donnelly, R. McDiarmid, L. Hayek & Mercedes, F. (2001). *Medición y monitoreo de la diversidad biológica, métodos estandarizados para anfibios*. Editorial Universitaria de la Patagonia, Argentina. 349 p.
- Jiménez, M. L. & Palacios, C. (1999). Incidencia de la chinche piedrera (*Dipetalogaster maximus*) (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae) vector de *Trypanosoma cruzi* en zonas urbanas de La Paz, Baja California Sur, México. *Anales del Instituto de Biología*, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología, 70: 215-221.
- Levine, N. D. & Nye, R. R. (1977). A survey of blood and other tissue parasites of leopard frogs *Rana pipiens* in the United States. *J. Wildl. Dis.*, 13: 17-23.

- Licón-Trillo, A., Balsimelli-De La Peña, K., Acosta-Legarda, M., Leal-Berumen, I., Noguera-Torres, B. & Martínez-Ibarra, J. (2010). *Infeción natural por Trypanosoma cruzi en triatomíneos del Centro y Norte de México*.
- Lugo, A., Alcocer, J., Sánchez, M. & Escobar, E. (1998). Littoral protozoan assemblages from two Mexican hyposaline lakes. *Hydrobiologia*, 381: 9-13.
- Mayén-Estrada, R., Reyes-Santos, M. & Vicencio-Aguilar, M. (2014). Biodiversidad de protistas (flagelados heterótrofos) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85: 26-33.
- Mattoon, A. (2000). El declive de los anfibios. *World Watch*. pp: 10-13.
- McKenzie, V. J. & Starks, H. A. (2008). Blood parasites of two costa rican amphibians with comments on detection and microfilaria density associated with adult filarial worm intensity. *Int. J. Parasitol.*, 94: 824-829.
- Merino-Trujillo, A. (2011). Como escribir documentos científicos (Parte 3). Artículo de revisión. *Salud en Tabasco*, 17 (2): 36-40.
- Menezes, L. D. (2007). *Ocorrência de hemoparasitas do Gênero Trypanosoma (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) e hemogregarinas em Anuros dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul*. Tesis de Posgrado. Instituto de Biociencias, campus Botucatu.
- Monks, S., Pulido, G., Bautista, C., Alemán, B., Falcón, J. & Gaytán, J. (2013). El uso de helmintos parásitos como bioindicadores en la evaluación de la calidad del agua: Lago de Tecocomulco vs. Laguna de Metztlán, Hidalgo, México. *University of Nebraska – Lincoln*.
- Moo, L. D. (2009). *Diversidad y distribución geográfica de las especies de los géneros Brumptomyia y Lutzomyia en Quintana Roo, México*. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán.
- Netherlands, E. C., Cook, C. A., & Smith, N. J. (2014). Hepatozoon species (Adeleorina: Hepatozoidae) of African bufonids, with morphological description and molecular diagnosis of *Hepatozoon ixoxo* sp. nov. parasitising three *Amietophrynus* species (Anura: Bufonidae). *Parasites & Vectors*, 7(1): 5-12.

- Netherlands, E. C., Cook, C. A., Kruger, J.D., Preez, H. & Smith, N. J. (2015). Biodiversity of frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. *International Journal for Parasitology*, 4(1): 135-141.
- Ochoa-Díaz, Y. O., López-Moreno, C. Y., Rendón-Maldonado, J. G. & López-Moreno, H. S. (2012). Molecular diagnosis of *Leishmania mexicana* in a cutaneous leishmaniasis case in Sinaloa, Mexico. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 12: 78-80.
- O'Brien, S. J. & Evermann, J. F. (1988). Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecol. and Evol.*, 3(10): 254-259.
- Paredes, L., León, V. & García, L. (2004). Helminth infracommunities of *Rana vaillanti* Brocchi (*Anura: Ranidae*) in Los Tuxtlas, Veracruz, México. American Society of Parasitologists: *Journal of Parasitology*, 90(4): 692-696.
- Parra, O. G., Flores-Villela, O. & Mendoza-Almeralla, C. (2014). Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 460-466.
- Pérez-Mutul, J., Balam-Tzeek, L. & Canto-Lara, S. (1994). Identificación de protozoarios del género *Leishmania* con sondas biotinadas de kDNA en la Península de Yucatán, México. *Revista Biomédica*, 5: 60-69.
- Readel, A. M. & Goldberg, T. L. (2010). Blood parasites of frogs from an equatorial African Montane Forest in Western Uganda. *Journal of Parasitology*, 96(2): 448-450.
- Reyes, B. H. (2020). Artículos de Revisión. *Revista médica de Chile*, 148(1): 103-108.
- Rico-Hernández, G. (2004). Implicaciones de enfermedades infecciosas en la conservación de fauna silvestre de vida libre. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, 7(1): 59-67.
- Rivera, F., Lugo, A., Ponce, J., Lares, F. & Ortiz, R. (1986). Zooflagellates in an anaerobic waste stabilization pond system in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution*, 27: 199-214.
- Rivera, F., Lugo, A., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Gallegos, E., Labastida, A. & Chávez, M. (1992). Seasonal distribution of air-borne protozoa in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution*, 61: 17-36.
- Rivera, A. R. (2010). *Comunidad componente de helmintos parásitos en anfibios y reptiles de Tlacotalpan, Veracruz*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. México, D.F.

- Romero, C. R. (2007). *Microbiología y parasitología humana*. 3^oed. Editorial médica panamericana. México. pp: 733-739.
- Salazar, P. M., Rojas, G., Bucio, M., Cabrera, M., García, G., Ruiz, A., Guevara, Y. & Tapia, R. (2007). Seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* y su asociación con factores de riesgo en menores de 18 años de Veracruz, México. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 22: 75-82.
- Salazar-Schettino, P., Rojas-Wastavino, G., Cabrera-Bravo, M., Bucio-Torres, M., Martínez-Ibarra, J., Monroy-Escobar, M., Rodas-Retana, A., Guevara-Gómez, Y., Vences-Blanco, M., Ruiz-Hernández, A. & TorresGutiérrez, E. (2010). A revision of thirteen species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1: 57-80.
- Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M., Cabrera-Bravo, M. & Ruiz-Hernández, A. L. (2011). Presentación de dos casos de enfermedad de Chagas aguda en México. *Gaceta Médica de México*, 147: 63-69.
- Sandoval-Ruiz, C. A., Zumaquero-Ríos, J. L., Linares, G., Alejandre, R., Cedillo, M. & López, J. (2004). Infección natural con *Trypanosoma cruzi* en triatominos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectores de la enfermedad de Chagas en San Antonio Rayón, Jonotla, Puebla, México. *Tecnociencia*, 6: 39-47.
- Santos, B. G. (2004). Enfermedades infecciosas y su papel en la declinación mundial de las poblaciones de anfibios. CONABIO. *Biodiversitas*, 56: 1-6.
- Schacher, J. F. & Crans, W. J. (1973). *Foleyella flexicauda* sp. n. (Nematoda: Filarioidea) from *Rana catesbeiana* in New Jersey, with a review of the genus and erection of two new subgenera. *Journal of Parasitology*, 59: 685-691.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M. & Pietzsch, T. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9: 76-82.
- Smith, T. & Smith, R. (2007). *Ecología*. 3^oed. Pearson Educación, S.A, España. pp: 327-332.
- Thomas, F., Bonsall, M. & Dobson, A. (2006). *Parasitism, biodiversity, and conservation; Parasitism and Ecosystems*. Oxford University Press, New York. pp. 124-135.
- Toledo, V. (1987). La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*. Centro de Ecología UNAM, 14(81): 17-30.

- UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). (2018). *La Lista Roja de UICN*.
- Velasco-Castrejón, O., Walton, B. C., Rivas-Sánchez, B., García, M. F., Lazaro, G. J., Hobart, O., Roldán, S., FlorianiVerdugo, J., Munguía-Saldana, A. & Berzaluce, R. (1997). Treatment of cutaneous leishmaniasis with localized current field (radio frequency) in Tabasco, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57: 309-312.
- Velasco-Castrejón, O., Rivas, S. B., Murguía, S. A. & Hobart, O. (2009). Leishmaniasis cutánea de perros en México. *Enfermedades infecciosas y microbiología*, 29(3): 135-140.
- Walton, A. C. (1964). The parasites of the Amphibia. *J. Wildl. Dis.*, 40: 1-39.
- Werner, J. K. & Walewski, K. (1976). Amphibian *Trypanosomes* from the McCormick Forest, Michigan. *The Journal of Parasitology*, 62(1), 20.
- Werner, J. K., Davis, J. S., & Slaght, K. S. (1988). Trypanosomes of *Bufo americanus* from northern Michigan. *Journal of Wildlife Diseases*, 24(4): 647–649.
- Werner, J. K. (1993). Blood parasites of amphibians from Sichuan Province, People's Republic of China. *J Parasitol.*, 79: 356-363.
- Zichus, T. (2002). The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. *Acta Zool Lituanica*, 12: 197-20.